斜纹夜蛾核型多角体病毒不同分离株基因序列的同源性分析

刘艳荷[1,2]，方继朝[1,*]

（1. 江苏省农业科学院植物保护研究所，南京 210014；2. 广东海洋大学农学院，广东湛江 524088）

摘要：研究 SpltMNPV 不同分离株及 SpltMNPV 分离株与 SpliNPV 间基因序列的同源性，为 SpltMNPV 分离株的利用提供理论基础。根据已发表的斜纹夜蛾核型多角体病毒（SpltMNPV）中国株（Zh）基因组全序列（AF527603）和海灰翅夜蛾核型多角体病毒（SpliNPV）Not I-D 片段序列（AF527603）设计引物，PCR 方法扩增得到 SpltMNPV 日本福冈株（Fu）、埃及株（Eg）和小笠原株（Og）的 ORF39 ~ ORF42 和 ORF119 ~ ORF124 编码区全序列。SpltMNPV 不同分离株及 SpltMNPV 分离株与 SpliNPV 间基因序列的相似性比较，Zh 株和 Og 株，Eg 株、Fu 株和 SpliNPV 的相似性高，而 Zh 株和 Eg 株、Fu 株或 SpliNPV，Og 株和 Eg 株、Fu 株或 SpliNPV 的相似性都比较低。亦即 SpltMNPV 3 种基因型，B 型和 C 型的同源性高，A 型与 B 型或 C 型的同源性比较低，但 A 型与 SpliNPV 的同源性高；同一基因型内不同分离株（Eg 株和 Fu 株）的同源性高。ETG 分子进化分析表明 Eg 株、Fu 株和 SpliNPV 处于一个分支，而 Eg 株、Fu 株和 SpliNPV 与 Zh 株和 Og 株则处于不同的分支。因此推断 Eg 株和 Fu 株为 SpliNPV 的分离株，而 Og 株为 SpltMNPV 的分离株。

关键词：斜纹夜蛾核型多角体病毒；分离株；基因；序列分析；同源性；系统发育

中图分类号：Q965.8 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)08-0817-07

Homologous analysis of gene sequences in *Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolates

LIU Yan-He[1,2]，FANG Ji-Chao[1,*]（1. Institute of Plant Protection，Jiangsu Academy of Agricultural Sciences，Nanjing 210014，China；2. Agricultural College，Guangdong Ocean University，Zhanjiang，Guangdong 524088，China）

Abstract：In order to provide the theory base for the utilizing of SpltMNPV isolates，the homologous analysis of gene sequences among *Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus（SpltMNPV）isolates or between SpltMNPV and *S. littoralis* nucleopolyhedrovirus（SpliNPV）were studied. According to the complete genome sequence（AF527603）of SpltMNPV and the sequence（AF527603）of SpliNPV Not I-D fragment deposited in GenBank，five pairs of primers were designed and used. ORF39 – ORF42 and ORF119 – ORF124 of SpltMNPV three isolates，*i.e.*，Fukuoka（Fu），Egypt（Eg）and Ogasawara（Og），were amplified by PCR. The comparison of ORF39 – ORF42 and ORF119 – ORF124 nucleotide and amino acid sequences of SpltMNPV isolates，*i.e.*，Chinese isolate（Zh），Eg，Fu and Og，with those of SpliNPV indicated that the similarity between Zh and Og，or between Eg，Fu and SpliNPV is as high as over 99%，but the similarity between Zh and Eg，Fu，SpliNPV or between Og and Eg，Fu，SpliNPV is as low as 74%. This means that among SpltMNPV three genotypes，the homology between B and C is high，A and B or C is low，but the homology between A and SpliNPV is high. The homology of the isolates within the same genotype is high too. The neighbor-joining tree based on amino acid sequences of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase（EGT）in 29 nucleopolyhedroviruses and 10 granuloviruses was established. In the phylogenetic tree，EGTs of Eg and Fu

基金项目：中国博士后科学基金项目(20060390946)；江苏省博士后基金和江苏省农业科技创新资金项目[cx（07）606]

作者简介：刘艳荷，女，1965 年生，博士，副教授，研究方向为昆虫病毒分子生物学，E-mail：yanheliu@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：fangjc@jaas.ac.cn

收稿日期 Received：2007-03-27；接受日期 Accepted：2008-07-14

clustered into one clade with SpliNPV, which belonged to a larger clade that included the other SpltMNPV isolates. Based on the sequence alignment and the phylogenetic tree of baculovirus EGTs, it is inferred that Eg and Fu are the isolates of SpliNPV, but Og is the isolate of SpltMNPV.

Key words: *Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus; isolate; gene; sequence analysis; homology; phylogenetic development

斜纹夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhedroviruse, SpltMNPV)作为商品化杀虫剂已推广使用,对天敌和非靶标生物安全,害虫不易产生抗药性,而且还能在害虫种群形成流行病长期控制其为害。但SpltMNPV潜伏期长,杀虫速度慢,在害虫防治中常造成不可承受的经济损失。杆状病毒杀虫剂的这些缺陷可以通过两条途径得以改善,其一利用基因工程手段,在病毒基因组引入具有杀虫活性的基因,或删除病毒复制非必需基因,提高杀虫活性;其二从自然界存在的病毒株中筛选杀虫活性强的株系(Bonning and Hammock, 1996)。SpltMNPV在自然界存在多种分离株,具有丰富的表型和基因型。Maeda等(1990)根据宿主范围、生长特性、多角体蛋白和DNA限制性酶切图谱,将SpltMNPV分为4组:AcMNPV(*Autographa californica* MNPV)型;SpliNPV(*S. littoralis* NPV)型:包括SpliNPV-A和SpliNPV-B;SpltMNPV特有基因型。Talatsuka等(2003)将10个SpltMNPV分离株分为SpltMNPV型和SpliNPV型。不同基因型其表型也不同,致病性和杀虫速度有较大差异(Kamiya *et al.*, 2004)。因此研究SpltMNPV不同分离株基因序列的同源性,对基因工程重组病毒的构建及高活性病毒株的筛选都具有非常重要的意义。

SpltMNPV基因组全序列已测定,全长139 142 bp,150 bp以上的ORFs(open reading frames)144个(Pang *et al.*, 2001)。一些基因已被克隆并进行了功能分析,如多角体蛋白基因(polyhedrin, *polh*),*p*10,*odv-e*25(Li *et al.*, 2006),*gp*37,J结构域基因(*bjdp*)(Wang *et al.*, 2002),*bro-a*和*bro-b*,*p*74,*Splt*136,碱性核酸外切酶基因(*alk-exo*)*p*49(Yu *et al.*, 2005),*ie*0,*pk*,*egt*,泛素基因(*ubiquitin*),*ORF*97(Chen *et al.*, 2006),*ORF*137(Yin *et al.*, 2003)等,但对SpltMNPV不同分离株基因序列的同源性分析还未见报道。本研究以SpltMNPV基因组全序列(AF527603)和SpliNPV Not I-D片段序列(AF527603)设计引物,PCR方法获得SpltMNPV 3个分离株的ORF39~ORF42和ORF119~ORF124 10个ORFs,将这些基因序列与SpltMNPV中国株和SpliNPV进行相似性比较,研究SpltMNPV不同分离株及这些分离株与SpliNPV间的同源性,为SpltMNPV不同分离株的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验用SpltMNPV日本福冈株(简称Fu)、小笠原株(简称Og)和埃及株(简称Eg)已进行基因型分离,Fu株和Eg株为单一基因型A型,Og株分离出4种基因型,均属于C型(郭慧芳, 2005),现保存在江苏省农业科学院植物保护研究所作物虫害实验室。克隆用大肠杆菌TG1也由该实验室保存;PCR用的Taq酶购自TaKaRa公司,pGEM-T easy Vector、T_4 DNA连接酶均购自Promega(美国)公司;其他试剂为国产分析纯试剂。基因核苷酸序列的测定在Invitrogen(美国)公司进行。

1.2 病毒的繁殖

斜纹夜蛾幼虫自南京郊区甘蓝田采集,带回实验室繁殖。幼虫饲养温度27±1℃,相对湿度60%,光周期14L:10D。幼虫以麦胚人工饲料在玻璃缸中群体饲养,4龄后以6孔板单头饲养;蛹放置于同样的玻璃缸中;即将羽化时,移入成虫笼。成虫饲喂5%蔗糖水,以普通白纸置于笼壁供其产卵(Guo *et al.*, 2007a)。

通过斜纹夜蛾口服接种,繁殖SpltMNPV不同分离株的病毒。将人工饲料切成小块放入6孔板,滴加适量浓度病毒,每孔接入2~3头4龄初期斜纹夜蛾幼虫,待其吃完病毒液饲料后再补充新鲜人工饲料。饲养温度27±1℃、相对湿度60%、光周期14L:10D。幼虫发病后收集染病虫体,4℃保存备用。

1.3 SpltMNPV基因组DNA的提取

将收集的病虫研磨,纱布过滤移除虫体碎屑。500 r/min离心5 min、3 000 r/min离心5 min纯化多角体。将纯化的多角体以10^9 PIB悬浮于300 μL ddH_2O,加入100 μL 3×DAS碱裂解液(0.3 mol/L Na_2CO_3, 0.5 mol/L NaCl, 0.03 mol/L EDTA, pH 10.5),37℃水浴10 min。待裂解液变清后,加入200

μL TE（pH 8.0），8 000 r/min 离心 8 min。移出上清，加入蛋白酶 K 至终浓度 200 μg/mL，45～50℃水浴 2.5 h，再加入 10% SDS 至终浓度 1%，继续水浴 30 min。苯酚抽提 1 次，苯酚：氯仿：异戊醇（v：v：v = 25∶24∶1）抽提 2 次，无水乙醇沉淀基因组 DNA，干燥后溶解于 TE（pH 8.0）备用（Guo *et al*.，2007b）。

1.4　PCR 扩增及扩增产物的克隆

参照 GenBank 登录的 SpltMNPV 中国株（简称 Zh）基因组全序列和 SpliNPV I-D 片段序列设计引物（表 1），以上述方法提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR，扩增片段克隆入 pGEM-T easy Vector，测序拼接。

表 1　实验中所用的 PCR 引物

Table 1　PCR primers used in this study

名称 Name		核苷酸序列（5′－3′） Nucleotide sequence（5′ to 3′）
ORF39－ORF42	P1	TCAGACACAA CGTCCGTCAT
	P2	ATTTCGGCTTCGATCTGTCG
	P3	ATGATGA CTGTTGACGGGTT
	P4	TAATTCCGAATGATGCGG
ORF119－ORF124	P5	CAATAGGCTTATGTTTAATAATGTATA
	P6	CATCGAAACGTAAAAGTGTTYATA
	P7	TATRAACACTTTTACGTTTCGATG
	P8	CTTTTAATTGTACATTTCACATTCG
	P9	CGAATGTGAAATGTACAATTAAAAG
	P10	CGACATGTACRAGATAMTATTGATA

1.5　核苷酸序列及氨基酸序列的比较及分子进化分析

将所得 SpltMNPV 3 个分离株 10 个 ORFs 的核苷酸和氨基酸序列与已发表的 Zh 株和 SpliNPV 进行比较，并从 GenBank 下载另外 27 种 NPV 和 10 种 GV 的 EGT（ecdysteroid UDP-glucosyltransferase）氨基酸序列（表 2），利用 Clustal W 和 Treeview（V.1.6.6）等软件进行分子进化分析。

2　结果与分析

2.1　PCR 扩增 ORF39～ORF42 和 ORF119～ORF124 及其序列的测定

利用 P1 和 P2、P3 和 P4 两对引物，以 Og 株、Fu 株和 Eg 株病毒基因组 DNA 为模板，PCR 扩增出 6 条大约 1 700 bp 的片段，克隆到 pGEM-T easy Vector 中测序。序列拼接后，整个片段为 3 400 bp 左右，包括 ORF39（*bidp*），ORF40，ORF41 和 ORF42（*ChiA*）4 个 ORFs 的完整编码区。再利用 P5 和 P6、P7 和 P8、P9 和 P10 3 对引物，PCR 扩增出 9 条大约 2 000 bp 的片段，序列拼接后整个片段 5 900 bp 左右，包括 ORF119，ORF120（*bro-a*），ORF121（*egt*），ORF122（*fgf*），ORF123 和 ORF124（*pif*1）6 个基因的完整编码区。3 个分离株的 6 个 DNA 片段已在 GenBank 登录，序列接受号为 EU374634～EU374639。

表 2　EGT 分子进化分析中应用的 37 种杆状病毒 *egt* 基因的寄主及 GenBank 登录号

Table 2　Lists of the hosts and GenBank accession numbers of 37 *egt* genes of baculoviruses used in the phylogenetic analysis

NPV/GV	病毒 Virus	寄主 Host	GenBank 登录号 GenBank accession no.
NPV	AcMNPV	*Autographa californica*	NC_001623
	AhNPV	*Adoxophyes honmai*	AP006270
	AaNPV	*Amsacta albistriga*	AF204881
	AgNPV	*Anticarsia gemmatalis*	AF313417
	AsNPV	*Agrotis segetum*	DQ123841
	BmNPV	*Bombyx mori*	EU350576
	BsNPV	*Buzura suppressaria*	U61154
	CbNPV	*Clanis bilineata*	DQ504428
	CcNPV	*Chrysodeixis chalcites*	AY864330
	CfMNPV	*Choristoneura fumiferana*	NP_848326
	EoNPV	*Ecotropis obliqua*	YP_874315
	EpNPV	*Epiphyas postvittana*	AF052502
	HaSNPV	*Heliothis armigera*	AF217059
	HzSNPV	*Helicoverpa zea*	NP_542753
	HcNPV	*Hyphantria cunea*	YP_473326
	LdMNPV	*Lymantria dispar*	AF081810
	LsNPV	*Leucania separata*	AY394490
	McNPV-A	*Mamestra configurata*	U59461
	McNPV-B	*Mamestra configurata*	AY126275
	MbNPV	*Mamestra brassicae*	AB198074
	MvNPV	*Maruca vitrata*	YP_950737
	OlNPV	*Orgyia leucostigma*	NC_010276
	OpMNPV	*Orgyia pseudotsugata*	NP_046170
	PxMNPV	*Plutella xylostella*	DQ457003
	RoMNPV	*Rachiplusia ou*	AY145471
	SeMNPV	*Spodoptera exigua*	NP_037787
	SfMNPV	*Spodoptera frugiperda*	AY250076
	SpltMNPV	*Spodoptera litura*	AF527603
	TnSNPV	*Trichoplusia ni*	DQ017380
GV	AoGV	*Adoxophyes orana*	AF337646
	AsGV	*Agrotis segetum*	AY522332
	CaGV	*Clostera anachoreta*	AY880963
	ClGV	*Cryptophlebia leucotreta*	NP_891975
	CoGV	*Choristoneura occidentalis*	YP_654536
	CpGV	*Cydia pomonella*	NP_148925
	EaGV	*Epinotia aporema*	AF373031
	LoGV	*Lacanobia oleracea*	Y08294
	PoGV	*Phthorimaea operculella*	NP_663294
	PxGV	*Plutella xylostella*	NP_068337

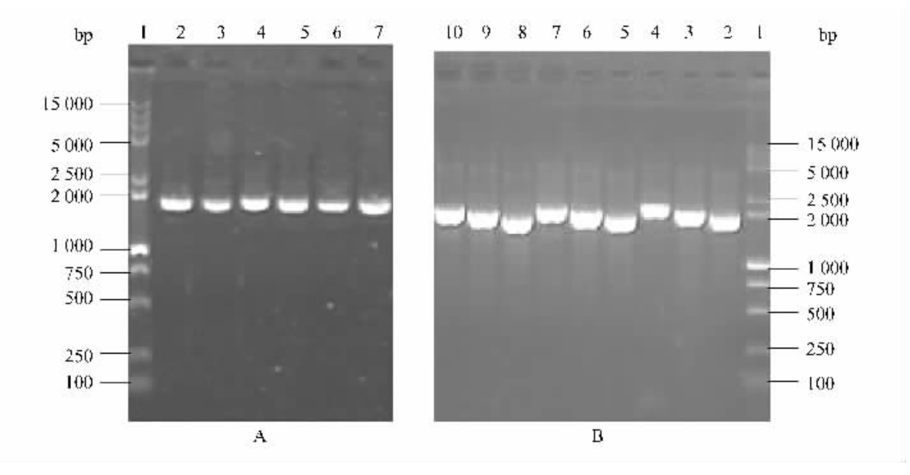


图 1　SpltNPV 不同分离株 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1　Electrophoresis of PCR products from the isolates of SpltMNPV

A：ORF39 ~ ORF42 的 PCR 产物 PCR products amplified with primer P1 and P2，P3 and P4.

1：DNA marker DL2000 + 15000；2 – 3：Eg；4 – 5：Fu；6 – 7：Og.

B：ORF119 ~ ORF124 的 PCR 产物 PCR products amplified with primer P5 and P6，P7 and P8，P9 and P10.

1：DNA marker DL2000 + 15000；2 – 4：Eg；5 – 7：Fu；8 – 10：Og.

2.2　SpltMNPV 不同分离株和 SpliNPV 10 个 ORFs 核苷酸和氨基酸序列的相似性比较

在克隆的 ORFs 中，只有 ORF42（*ChiA*），SpltMNPV 4 个分离株间的相似性都比较高，达 99% 以上(表 4)；而其余 ORFs，均为 Zh 株和 Og 株、Eg 株和 Fu 株的相似性比较高，99% 以上；ORF120，ORF121，ORF122，ORF123 和 ORF41 核苷酸序列的相似性达 100%，ORF119 氨基酸序列的相似性为 100%。SpliNPV 与 SpltMNPV Eg 株和 Fu 株的相似性也比较高，98% 以上，ORF123 氨基酸序列的相似性为 100%。SpltMNPV 的 Zh 株和 Eg 株、Fu 株，Og 株和 Eg 株、Fu 株的相似性比较低，ORF41 氨基酸序列的相似性仅为 74%；SpliMNPV 与 Zh 株和 Og 株的相似性也较低。10 个 ORFs 中，ORF40，ORF41 和 ORF123 为 SpltMNPV 的特有基因。ORF40 和 ORF41，Zh 株和 Og 株、Eg 株和 Fu 株氨基酸序列的相似性均为 100%，因 SpliMNPV 基因序列没有报道，无法进行比较；ORF123，Zh 株和 Og 株、Eg 株和 Fu 株及 SpliMNPV 氨基酸序列的相似性均为 100%；Zh 株或 Og 株与 Eg 株或 Fu 株的相似性则较低(表 3 和表 4)。杆状病毒特有基因只存在于一种或几种相近的病毒中，与宿主识别及病毒本身特异性有关，因此这些特有基因序列的变化在某种程度上反映了 SpltMNPV 不同分离株间及 SpltMNPV 与 SpliMNPV 的遗传变异。

表 3　4 个分离株 ORF119 ~ ORF124 核苷酸和氨基酸序列的相似性

Table 3　Similarity of nucleotide and amino acid sequences of ORF119 – ORF124 in the isolates

nt(%) / aa(%)	ORF119					ORF120					ORF121				
	Zh	Eg	Fu	Og	SpliNPV	Zh	Eg	Fu	Og	SpliNPV	Zh	Eg	Fu	Og	SpliNPV
Zh		86	86	99	87		88	88	100	87		85	85	99	85
Eg	89		99	86	98	88		100	88	99	87		100	85	99
Fu	89	100		86	98	88	100		88	99	87	100		85	99
Og	99	90	90		87	100	88	88		87	99	87	87		85
SpliNPV	89	99	99	90		87	98	98	87		87	99	99	87	

nt(%) / aa(%)	ORF122					ORF123					ORF124				
	Zh	Eg	Fu	Og	SpliNPV	Zh	Eg	Fu	Og	SpliNPV	Zh	Eg	Fu	Og	SpliNPV
Zh		84	84	99	84		87	87	100	87		83	83	99	83
Eg	83		100	84	99	90		100	87	99	80		99	83	99
Fu	83	100		84	99	90	100		87	99	81	98		99	83
Og	100	83	83		84	100	90	90		87	99	80	81		99
SpliNPV	83	99	99	83		90	100	100	90		82	95	96	85	

nt：核苷酸 Nuleotide；aa：氨基酸 Animo acid。表 4 同。The same for Table 4.

表 4　4 个分离株 ORF39 ~ ORF42 核苷酸和氨基酸序列的相似性

Table 4　Similarity of nucleotide and amino acid sequences of ORF39 – ORF42 in the isolates

nt（%） aa（%）	ORF39				ORF40				ORF41				ORF42			
	Zh	Eg	Fu	Og	Zh	Eg	Fu	Og	Zh	Eg	Fu	Og	Zh	Eg	Fu	Og
Zh		86	86	99		88	89	99		83	83	100		99	99	99
Eg	91		99	86	87		99	88	74		100	83	99		99	99
Fu	91	99		86	88	99		89	74	100		83	99	99		99
Og	99	90	91		100	87	88		100	74	74		99	99	99	

2.3　SpltMNPV 不同分离株的进化分析

克隆的 10 个 ORFs 中，*egt* 基因序列最为保守，BLAST score 为 890 bits。为此利用 Clustal W 和 Treeview（V. 1.6.6）软件，以 EGT 氨基酸序列绘制杆状病毒系统树（图 2）。进化树上，SpltMNPV 4 个分离株和 SpliNPV 聚集在一个大的进化分支，而后又分为两个小分支，Zh 株和 Og 株在一个小分支，而 Eg 株和 Fu 株与 SpliNPV 在另一个小分支。此外，以 PIF1 氨基酸序列绘制杆状病毒的系统树，同样 SpltMNPV 的 4 个分离株和 SpliNPV 在一个大分支，而后 Zh 株和 Og 株在一个小分支，Eg 株和 Fu 株与 SpliMNPV 处于另外小分支（结果未列出）。两个进化树上，SpltMNPV 和 SpliNPV 都与 LsMNPV 处在一个进化分支，但 Yang 等（2006）以多角体蛋白氨基酸序列对杆状病毒做进化树，SpltMNPV 和 SfMNPV 和 SeMNPV 处于一个单独分支，而与 LsMNPV 相距较远，可能同一种生物不同基因的进化速度不同。Zh 株和 Og 株、Eg 株和 Fu 株及 SpliNPV 基因的同源性都比较高，进化树上 Eg 株、Fu 株和 SpliNPV 总是在一个分支，而与 Zh 株和 Og 株处于不同的分支，因此推断 Zh 株和 Og 株为 SpltMNPV 的分离株，而 Eg 株、Fu 株为 SpliNPV 的分离株。

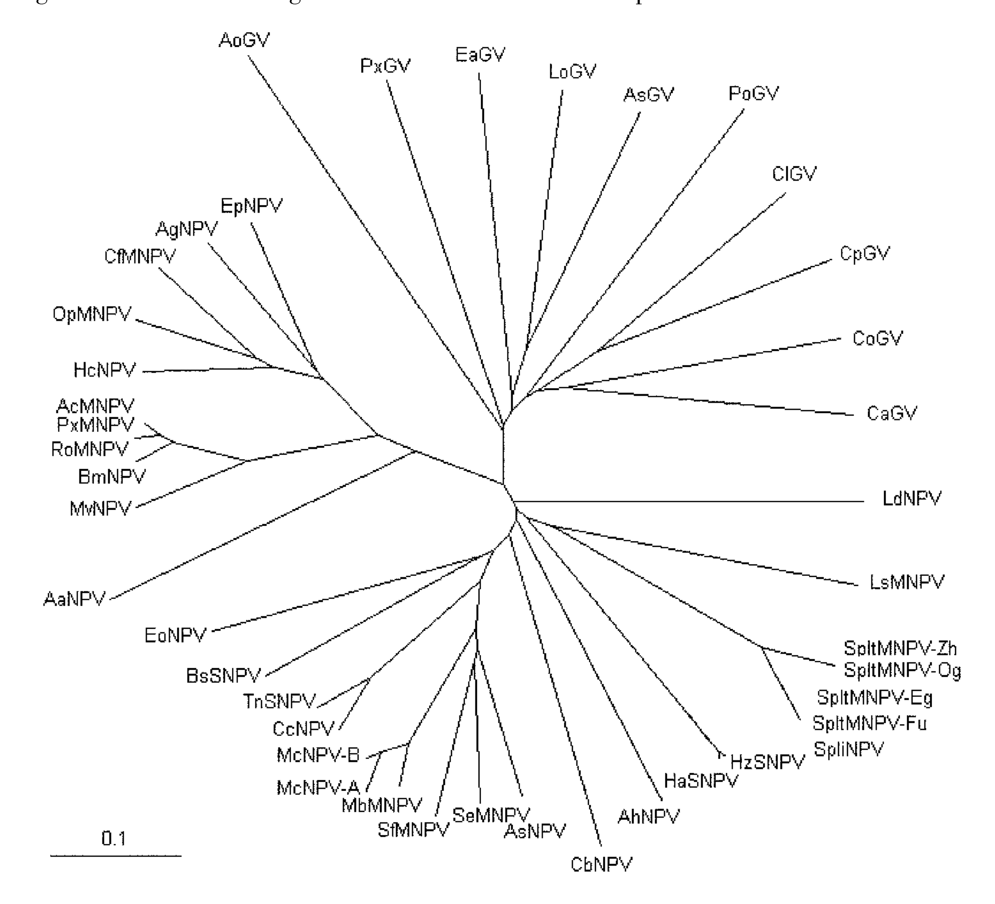


图 2　SpltMNPV 4 个分离株与其他 36 种杆状病毒 EGT 氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig. 2　The NJ phylogenetic tree of four isolates of SpltMNPV and the other 36 baculoviruses based on EGT amino acid sequences

3 讨论

斜纹夜蛾 *S. litura* 和海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 亲缘关系很近，为一个属的昆虫，而且 SpltMNPV 很多分离株在海灰翅夜蛾细胞系中生长很好，SpliNPV 在斜纹夜蛾幼虫中也能增殖（Maeda *et al.*，1990），因此推测从这两种昆虫分离得到的 NPV 可能相似或相同。根据限制性内切酶图谱、DNA 杂交实验和在细胞中复制等特性，SpliNPV 分为 SpliNPV-D 和 SpliNPV-T（Cherry and Summers，1985）或 SpliNPV-A 和 SpliNPV-B 两个组（Kislev and Edelman，1982）；SpltMNPV 分为 SpltMNPV 和 SpliNPV 两个组（Takatsuka *et al.*，2003），或 AcMNPV、SpliNPV-A、SpliNPV-B 和 SpltMNPV 特有基因型（Madae *et al.*，1990）。本研究克隆了 SpltMNPV A 型、C 型 3 个分离株的 10 个 ORFs，与 SpltMNPV Zh 株（B 型）和 SliNPV 进行相似性比较，C 型和 B 型相似性很高，达 99% 以上，其中 ORF120，ORF123 和 ORF41 为 100%；A 型与 B 型、C 型的相似性都比较低，但 A 型与 SliNPV 有较高的相似性。因此根据前人及本研究结果，可以将 SpltNPV 分为 SpltMNPV 型和 SpliNPV 型两种类型，SpltMNPV 型包括 B 型和 C 型，即中国、越南、印度、菲律宾和日本的三岛和小笠原等病毒株；SpliNPV 型包括 A 型，有日本静冈、富冈、鹿儿岛和马来西亚、埃及等病毒株。Kamiya 等（2004）报道，C 型酶切图谱与以前 *S. littoralis* 和 *S. litura* 幼虫分离的病毒都不同，为一种新的类型，但 C3 株的 *ie*0，*gp*41 和 *p*10 等基因核苷酸序列与 Zh 株的相似性分别为 99.8%，99.9% 和 99.7%（朱江等，2004；胡兆丽，2005；盛晔等，2007），与本研究结果不一致，可能病毒基因组 DNA 酶切图谱与基因序列的相似性有时并非完全一致。

斜纹夜蛾核型多角体病毒 SpltMNPV 型和 SpliNPV 型基因的同源性比较高，核苷酸序列的相似性为 83% ~ 88%，氨基酸序列的相似性为 80% ~ 90%。但也有一些基因，它们的同源性更高，如本研究克隆的 ORF42，SpltMNPV 4 个分离株间 10 个 ORFs 核苷酸序列和氨基酸序列的相似性均为 99% 以上；SpltMNPV A 型、B 型和 C 型多角体蛋白基因 *polh* 与中国株核苷酸序列的相似性为 98.5%，100% 和 99.9%，氨基酸序列的相似性为 100%，100% 和 99.6%（朱江等，2004）。因此，在 SpltMNPV 基因组中，存在一些非常保守的基因，在不同分离株间其核苷酸序列和氨基酸序列的差异很小。

以前对 SpltMNPV 不同分离株的研究主要是对宿主昆虫的毒力测定，细胞内的繁殖特性及基因组 DNA 的限制性内切酶图谱等，根据这些特性对 SpltMNPV 分离株进行分组，但从未对这些分离株的基因进行克隆，从基因水平对 SpltMNPV 分离株的遗传差异进行比较分析。本研究不仅克隆了 SpltMNPV 3 个分离株 10 个 ORFs，还从 GenBank 搜索了 39 种杆状病毒（29 种 NPV 和 10 种 GV）*egt* 基因的氨基酸序列，进行分子进化分析，进一步证明斜纹夜蛾核型多角体病毒分为 SpltMNPV 型和 SpliNPV 型两大类。昆虫杆状病毒的 EGT 可以分为 3 群，即 GV（10 种 GV），NPV Group Ⅰ（11 种 NPV）和 NPV Group Ⅱ（21 种 NPV），与多角体蛋白氨基酸序列的进化树类似。本研究澄清了 SpltMNPV 不同分离株的关系，为这些分离株的应用和进一步研究提供了基础资料，同时也丰富了以前 *egt* 基因的进化分析（阎庆生等，1999）。

参 考 文 献（References）

Bonning BC，Hammock BD，1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu. Rev. Entomol.*，41：191 – 210.

Chen W，Li Z，Li S，Li L，Yang K，Pang Y，2006. Identification of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus ORF97，a novel protein associated with envelope of occlusion-derived virus. *Virus Genes*，32（1）：79 – 84.

Cherry CL，Summers MD，1985. Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.*，46：289 – 295.

Guo HF，2005. Approaches and Mechanisms for Improvement of Nucleopolyhedroviruses. Ph. D. Dissertation，Nanjing Agricultural University，Nanjing.［郭慧芳，2005. 昆虫核型多角体病毒的增效途径和机理. 南京：南京农业大学博士学位论文］

Guo HF，Fang JC，Wang JP，Zhong WF，Liu BS，2007a. Interaction of *Xestia c-nigrum* granulovirus with peritrophic matrix and *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura*. *Journal of Economic Entomology*，100（1）：20 – 25.

Guo HF，Fang JC，Liu BS，Wang JP，Zhong WF，Wan FH，2007b. Enhancement of the biological activity of nucleopolyhedrovirus through disruption of the peritrophic matrix of insect larvae by chlorfluazuron. *Pest Management Science*，63（1）：68 – 74.

Hu ZL，2005. Analysis of *Spodoptera litura* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Polyhedrin and gp41 Gene and Construction of Transfer Vector Containing GFP. MSc Thesis，Suzhou University，Suzhou.［胡兆丽，2005. 斜纹夜蛾核型多角体病毒多角体蛋白及 gp41 基因分析及带 GFP 标记的转移载体的构建. 苏州：苏州大学硕士学位论文］

Kamiya K，Zhu J，Murata M，Laviñña-Caoili BA，Ikeda M，Kobayashi M，Kawamura S，2004. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the cotton cutworm，*Spodoptera litura*（Lepidoptera：Noctuidae）in Japan. *Biological Control*，31（1）：38 – 48.

Kislev N，Edelman M，1982. DNA restriction pattern differences from geographic isolates of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*，119：219 – 222.

Li Z，Pan L，Yu H，Li S，Zhong G，Pang Y，2006. Identification and characterization of odv-e25 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*，32（1）：13 – 19.

Maeda S，Mukohara Y，Kondo A，1990. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. *J. Gen. Virol.*，71：2 631 – 2 639.

Pang Y，Yu J，Wang L，Hu X，Bao W，Li G，Chen C，Han H，Hu S，Yang H，2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*，287（2）：391 – 404.

Sheng Y，Hu ZL，Wang WB，Li XP，Zhu J，2007. Expression and sequence analysis of ie0 gene from the genome of Japanese strain（c3）in *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus（SpltMNPV）. *Bulletin of Science and Technology*，23（3）：372 – 377.［盛晔，胡兆丽，王文兵，李新平，朱江，2007. 斜纹夜蛾核型多角体病毒日本株（C3）ie0 基因的序列分析和表达. 科技通报，23（3）：372 – 377］

Takatsuka J，Okuno S，Nakai M，Kunimi Y，2003. Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura*（Lepidoptera：Noctuidae）. *Biological Control*，26：32 – 39.

Wang L，Yu J，Yin C，Li Z，Hu X，Pang Y，2002. Characterization of a J domain gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*，25（3）：291 – 297.

Yu M，Li Z，Yang K，Lin T，Gong Y，Pan L，Pang Y，2005. Identification of the apoptosis inhibitor gene p49 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*，31（2）：145 – 151.

Yin C，Yu J，Wang L，Li Z，Zhang P，Pang Y，2003. Identification of a novel protein associated with envelope of occlusion-derived virus in *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*，26（1）：5 – 13.

Yan QS，Pang Y，Yang J，Nong G，OuYang XG，Dai XJ，1999. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *Chinese Journal of Biotechnology*，15（2）：176 – 182.［阎庆生，庞义，杨洁，农广，欧阳小光，代小江，1999. 斜纹夜蛾核多角体病毒 *egt* 基因的核苷酸全序列分析及同源性比较. 生物工程学报，15（2）：176 – 182］

Zhu J，Shen SD，Wang WB，Zhu YF，Cao GL，Hu ZL，Sheng Y，2004. Clone and sequence analysis of p10 gene from the genome of Japanese strain（C3）in SpliMNPV. *Journal of Suzhou university*（*Natural and Science Edition*）：20（3）：72 – 77.［朱江，沈颂东，王文兵，朱玉芳，曹广力，胡兆丽，盛晔，2004. 斜纹夜蛾核型多角体病毒日本株（C3）p10 基因的克隆及序列分析，苏州大学学报（自然科学版），20（3）：72 – 77］

Zhu J，Shen SD，Wang WB，Zhu YF，Ikeda M，Hu ZL，Sheng Y，2004. Proliferation characteristics of three Japanese strains of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus in cultural cells and sequence analysis of their polyhedrin genes. *Acta Entomologica Sinica*，7（5）：543 – 550.［朱江，沈颂东，王文兵，朱玉芳，池田素子，胡兆丽，盛晔，2004. 日本三株斜纹夜蛾核型多角体病毒的增殖特性及其多角体蛋白基因的序列分析. 昆虫学报，7（5）：543 – 550］

（责任编辑：赵利辉）